

Requested Patent: JP1083093A
Title: PROTECTED BIOTIN DERIVATIVES. ;
Abstracted Patent: EP0305201, A3, B1 ;
Publication Date: 1989-03-01 ;
Inventor(s): EDGE MICHAEL DEREK ;
Applicant(s): ICI PLC (GB) ;
Application Number: EP19880307934 19880826 ;
Priority Number(s): GB19870020394 19870828 ;
IPC Classification: C07D495/04 ; C07F9/65 ; C07H21/00 ; C12Q1/68 ;
Equivalents:

AU2113188, AU614764, CA1340343, DE3855693D, DE3855693T, DK477488,
FI883931, JP2746934B2, NO883822, NZ225944, PT88347, US5247081,
ZA8806215

ABSTRACT:

Processes for the preparation of biotinylated polynucleotides and analogues thereof and protected intermediate products for use in such processes are described and claimed. The processes may be conveniently used in the automated synthesis of biotinylated polynucleotide on a DNA synthesiser. The polynucleotides so prepared may be used as labelled probes e.g. as diagnostic tools for clinical and research uses.

⑪ 公開特許公報 (A)

昭64-83093

⑤Int.Cl.⁴
C 07 H 21/00
// C 12 Q 1/68

識別記号
7417-4C
A-6807-4B

④公開 昭和64年(1989)3月28日

審査請求 未請求 請求項の数 16 (全 23 頁)

⑤発明の名称 保護されたビオチン誘導体

②特 願 昭63-214758

②出 願 昭63(1988)8月29日

優先権主張 ②1987年8月28日③イギリス(GB)④8720394

⑦發明者 マイケル・デレク・エ イギリス国チエシャー州コングリトン, イユーダー・ウェツジ イ 6

⑦出願人 インペリアル・ケミカル・インダストリー イギリス国ロンドン市エスタブリュー1ピー・3ジエイエフ, ミルバンク, インペリアル・ケミカル・ハウス (番地なし)

⑦代理 人 弁理士 湯浅 恒三 外3名

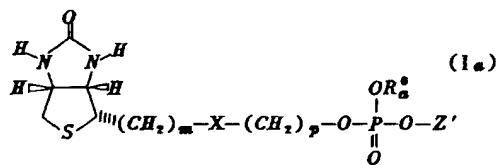
明 講 書

1. [発明の名称]

保護されたビオチン誘導体

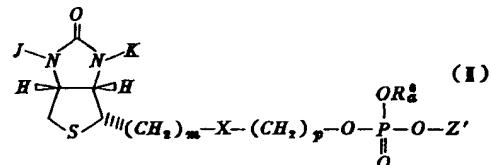
2. [特許請求の範囲]

1. 式 I a



[式中、 m は4または5であり、Xは直接結合、
 $-O-P(O)(OR_a^*)-O-$ 、 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-CONH-$ 、
 $-NHCONH-$ または $N-R^*$ (R^* は直鎖または分枝鎖 C_{1-10} アルキル基を表わす)を表わし、 p は
0~16の整数であり、ただしXが直接結合以外
のものである場合、 p は少なくとも2の整数であ
り、 R_a^* は水素原子またはホスフェート保護基を
表わし、 Z' は保護されていない形の、または塩
基および/またはホスフェート部分が保護基を有
する形のヌクレオチド配列を表わし、該ヌクレオ

チド類は支持体に結合していてもよい]の化合物
またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式 II



[式中、 m 、 p 、X、 R_a^* および Z' は上記に定
めたものであり、JおよびKは同一でも異なつて
てもよく、それぞれ水素原子を表わすか、またはヌ
クレオチドリン酸化と適合性であり、化合物の親
油性を高める保護基を表わし、JおよびKのうち
少なくとも一方は水素原子以外のものである]の
化合物またはそれらのイソ同族体を脱保護し；こ
れにより水素原子以外のJまたはK基を除去して
式 I a またはそれらのイソ同族体を得ることより
なる方法。

2. Jおよび/またはKがテトラヒドロピラニル、
フリル、ジメトキシトリチル、キサンテニル、テ
トラヒドロチオピラニル、ベンゾイルまたはアシ

(1)

(2)

ル基を表わす、請求項1に記載の方法。

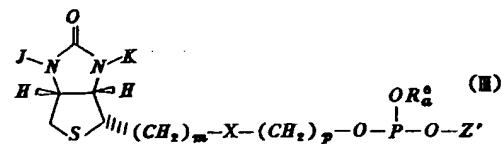
3. R_a^a が水素原子、メチル、2-シアノエチル、2-クロルフェニル、2,2,2-トリハロ-1,1-ジメチルエチル、5-クロルキノリン-8-イル、2-メチルチオエチル、またはフェニル環においてハログン原子もしくは NO_2 より置換されていてもよい2-フェニルチオエチル基を表わす、請求項1または2に記載の方法。
4. J および/ X または K がテトラヒドロピラン-2-イル、6-メトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル、またはジメトキシトリチルを表わす、請求項1ないし3のいずれかに記載の方法。
5. J および K の一方のみが保護基を表わし、 J および K の他方が水素原子を表わす、請求項1ないし4のいずれかに記載の方法。
6. 請求項1ないし5のいずれかに記載の式Ⅲの化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅲ

(3)

(式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は上記において定めたものであり、 R^a および R^b は同一でも異なるつてもよく、それぞれ C_{1-10} の直鎖もしくは分枝鎖アルキル基であるか、または R^a と R^b はそれらの間にある窒素原子と共に、異種原子1、2、3または4個を含む5~7員複素環を表わし、窒素原子のはかに存在する異種原子は酸素、窒素およびイオウから選ばれ、 R^c は上記において定めた R_a^a に対応するが、ただし水素原子以外のものである)の化合物またはそれらのイソ同族体を、上記において定めた基 Z' のヌクレオチド配列に対応するが、ただし式Ⅳの化合物への付着位置においては保護されておらず、このためこの位置での結合が可能である式 Z' のヌクレオチド配列と結合させ、これにより式Ⅲの化合物またはそれらのイソ同族体を得ることよりなる方法。

9. 前記式Ⅲ(式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 X 、 R_a^a および Z' は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する)の化合物またはそれらのイソ同族体。

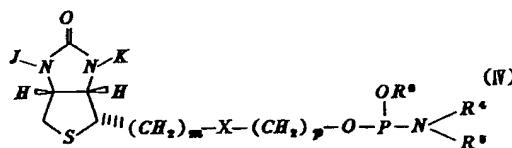
(6)



[式中、 m 、 p 、 J 、 K 、 Z' 、 X および R_a^a は上記において定めたものである]の化合物またはそれらの同族体を置換することよりなる方法。

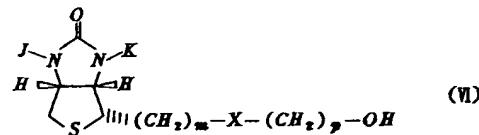
7. 前記式Ⅱ(式中、 m 、 p 、 X 、 R_a^a 、 Z' 、 J および K は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する)の化合物またはそれらのイソ同族体。

8. 前記式Ⅳ(式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 X 、 R_a^a および Z' は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する)の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅳ

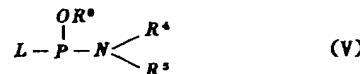


(4)

10. 前記式Ⅳ(式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 X 、 R^a 、 R^b および R^c は請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する)の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅴ



[式中、 J 、 K 、 m 、 p および X は上記において定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体を式V



[式中、 R^a 、 R^b および R^c は上記において定めたものであり、 L は置換可能な基である]の化合物と反応させ、これにより式Ⅳの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させることよりなる方法。

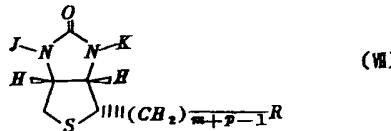
11. 前記式Ⅳ(式中、 J 、 K 、 m 、 p 、 R^a 、 R^b 、 R^c および X は請求項1ないし5のいずれかに記

(6)

酸の意味を有する]の化合物またはそれらのイソ同族体。

12. 前記式Ⅶ [式中、J、K、m、 α およびXは請求項1ないし5のいずれかに記載の意味を有する]の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、

(a) Xが直接結合を表わす場合、対応する一般式Ⅷ

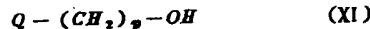


[式中、J、K、mおよび α は上記において定めたものであり、Rは対応するアルコール類に還元しうる基を表わす]の化合物またはそれらのイソ同族体を還元し、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(b) Xが-O-P(O)(OR α)-O-を表わし、R α が水素原子またはホスフェート保護基を表わす場合、式Ⅸ

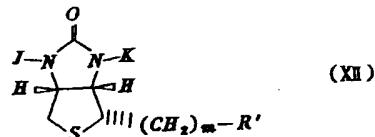
(9)

のであり、L'は置換可能な基を表わす]の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅹ

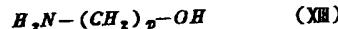


[式中、 α は上記において定めたものであり、Qは陰イオンである水酸基、チオール基または式N-R β (R β は上記において定めたものである)のアミン残基を表わす]の化合物と反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(d) Xが-CONH-を表わす場合、一般式Ⅺ

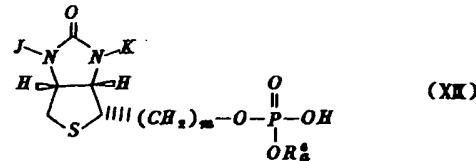


[式中、J、Kおよびmは上記において定めたものであり、R'はカルボン酸残基またはそれらの誘導体を表わす]の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅻ



[式中、 α は上記において定めたものである]の

(9)

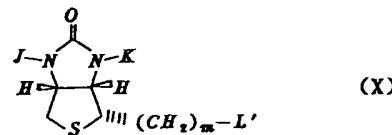


[式中、J、K、mおよびR'は上記において定めたものである]のリン酸化ビオチノール誘導体またはそれらのイソ同族体を式Ⅲ



[式中、 α は上記において定めたものである]の適當なジオールと反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(c) Xが-S-、-O-またはN-R β を表わし、R β が直鎖または分枝鎖C₁₋₁₀アルキル基を表わす場合、式X

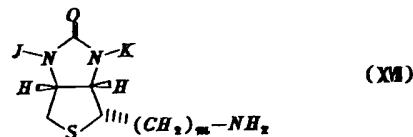


[式中、J、Kおよびmは上記において定めたも

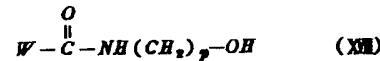
(8)

ヒドロキシアルキルアミンと反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させ、

(e) Xが-NHC(=O)NH-を表わす場合、一般式Ⅼ



[式中、J、Kおよびmは上記において定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体を一般式Ⅼ



[式中、 α は上記において定めたものであり、Wは置換可能な基を表わす]の化合物と反応させ、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させる

ことよりなる方法。

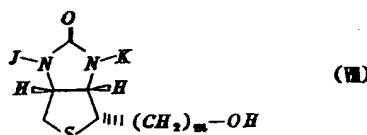
13. 前記式Ⅶ [式中、J、K、m、 α およびXは

(10)

請求項 1 ないし 5 のいずれかにおいて定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体。

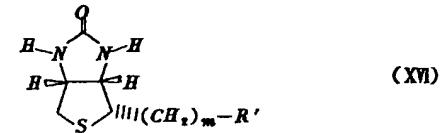
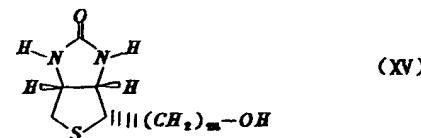
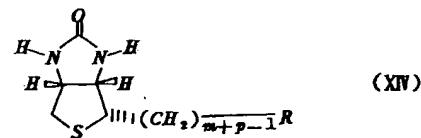
14. 前記式Ⅶ [式中、J、K、m、p および X は請求項 1 ないし 5 のいずれかにおいて定めたものであり、R は対応するアルコール類に還元しうる基を表わし、ただし J および K はいずれも C₁-、アルキル、C₁-、アルケニル、アセチル、メトキシカルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない]の化合物またはそれらのイソ同族体。

15. 前記式Ⅷ、式Ⅸ



または前記式Ⅹ [これらの式中、J、K、m、p、R および R' は請求項 1 2 において定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、対応する一般式 XIV、XV または XVI

(11)



[式中、J、K、m、p、R および R' は上記において定めたものである]の誘導体またはそれらのイソ同族体を式 J' の化合物および/または式 K' の化合物 [これらの化合物 J' および K' はそれぞれ上記において定めた基 J および K の前駆物質である]と反応させ、これにより式Ⅶ、ⅧまたはⅩの化合物またはそれらのイソ同族体を形成さ

(12)

ることよりなる方法。

16. 請求項 1 ないし 6、8、10、12 および 15 のいずれかに記載の方法の 2 以上からなり、これらの方法が順次行われることよりなる方法。

3. [発明の詳細な説明]

(産業上の利用分野)

本発明はビオチニル化ポリヌクレオチドおよびそれらの同族体の製法、ならびにそれらの方法に用いる中間体に関する。

(従来の技術および課題)

標識ポリヌクレオチドプローブが広範な用途に用いられることは周知であり、たとえばルーウィン (Lewis)、*Science* 221: 1167 (1983) およびクラウスナー (Klaussner) ら、*Bio/Technology*, 1: 471 (1983) に記載されている。標識オリゴヌクレオチドプローブは臨床用および研究用の診断手段として特に関心がもたらされている。

通常の放射性標識プローブは有効であり、感受性も高いが、たとえば臨床検査室においてスクリ

(13)

ーニング用としてルーテインに用いるのを制限する幾つかの問題を伴う。たとえば放射性標識プローブは潜在的に危険であり、廃棄の問題を生じる。さらに放射性標識プローブはしばしば不安定であり、標識として用いられる放射性物質 - 特に ³²P - の半減期が比較的短いため保存寿命が限られる。さらにオートラジオグラフによる検出には時間がかかり、放射性標識プローブの取扱いには適切な安全性トレーニングを受けた者が必要である。

従つてプローブを標識するために非放射性方法を採用することが望まれており、ある種のこのような方法がたとえば以下の文献に記載されている。D.C. ウォード (Ward)、1981 *ICN-UCLA* シンポジウム、3月 15~20 日にコロラド州キーストーンにおいて開催、“精製遺伝子を用いる開発の生物学”、1981 XXIII、1981、647~658 頁、アカデミック・プレス、編者 Donald D. Brown (Donald D. Brown) ら; および A.D.B. マルコーム (Malcolm) ら、第 604 国生化学会会合抄録、英國ケンブリッジ

(14)

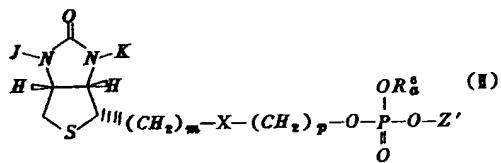
(1983年7月1日の会合)。ビオチンで標識されたプローブについても上記文献に広く記載されている。

ビオチンはオリゴヌクレオチドの標識に際して特に関心がもたれる。これはアビシンと強い相互作用を生じ、これによりたとえば酵素活性化された信号発生系または酵素標識をオリゴヌクレオチド型ハイブリダイゼーションプローブに好都合に結合させることができるのである。

ビオチン残基をホスフェート結合によりオリゴヌクレオチドに結合させる方法は既知であり、たとえば本出願人の欧州特許公開第202758号明細書に記載されている。この種の方法はホスホトリエステル化学によるものであり、これは特にたとえばDNA合成装置によるヌクレオチド配列の自動合成に採用されるホスホルアミダイト(phosphor amidite)化学と調和しない。さらにこれまでのところビオチンを保護された形でホスホルアミダイト化学によりヌクレオチド配列に結合させる好都合な方法は報告されていない。

(15)

チド鎖は支持体に結合していてもよい]の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅱ



[式中、 m 、 p 、 X 、 R_a^a および Z' は上記に定めたものであり、 J および K は同一でも異なつてもよく、それぞれ水素原子を表わすか、またはヌクレオチドリン酸化と適合性があり、化合物の親油性を高める保護基を表わし、 J および K のうち少なくとも一方は水素原子以外のものである]の化合物またはそれらのイソ同族体を脱保護し；これにより水素原子以外の J または K 基を除去して式Ⅰ。またはそれらのイソ同族体を得ることよりなる方法が提供される。

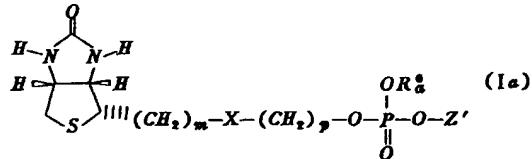
ここで用いる“イソ同族体(iso-equivalent)”という語は一般に、その語が示す式の化合物と同じ機能を有し、水素原子以外の J または K 基の不

(17)

(発明の要約)

本発明は上記の難点を少なくとも一部は除く方法を見出したこと、およびそれに用いる中間体に関する。

従つて本発明の一観点によれば、式Ⅰ。



[式中、 m は4または5であり、 X は直接結合、 $-O-P(O)(OR_a)-O-$ 、 $-S-$ 、 $-O-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCONH-$ または $N-R^a$ (R^a は直鎖または分枝鎖 C_{1-10} アルキル基を表わす)を表わし、 p は0~16の整数であり、ただし X が直接結合以外のものである場合、 p は少なくとも2の整数であり、 R_a^a は水素原子またはホスフェート保護基を表わし、 Z' は保護されていない形の、または塩基および/またはホスフェート部分が保護基を有する形のヌクレオチド配列を表わし、該ヌクレオ

(16)

在下でビオチン結合部、たとえばアビシン、ストレプトアビシンまたは抗ビオチン抗体との複合体を形成しうる化合物を意味する。従つて“イソ同族体”は一般にホスフェート基またはホスフィット基を介してヌクレオチド配列に結合するかまたは結合可能であり；かつ一般にヌクレオチドのリン酸化に適合し、この種の保護基が存在しない対応化合物よりもその化合物の親油性を高める保護基を少なくとも1種保有するか、または保有可能であろう。

脱保護を行う条件は保護基 J および/または K の性質に必然的に依存するであろう。たとえば酸不安定性の保護基は1種または2種以上の水性の酸、たとえば酢酸などの有機酸または塩酸などの無機酸の存在下で除去しうる。一方、塩基不安定性の保護基は1種または2種以上の塩基、たとえば水酸化アンモニウムなどの水性塩基の存在下で除去しうる。

J および/または K が下記のものを表わす式Ⅱの化合物を用いることが好ましい。テトラヒドロ

(18)

ピラニルたとえばテトラヒドロピラン-2-イル、6-メトキシ-テトラヒドロピラニルたとえば6-メトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル、フリルたとえば2-フリル、ジメトキシトリチルたとえば4,4'-ジメトキシトリチル、キサンテニルたとえば9-フェニルキサンテニル、テトラヒドロチオピラニルたとえばテトラヒドロチオピラン-2-イル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルたとえば4-メトキシテラヒドロチオピラン-2-イル、ベンゾイル、またはアシリル基、たとえば6個まで(たとえば3~6個)の炭素原子を含むもの。好ましい保護基はテトラヒドロピラン-2-イル、6-メトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル、またはジメトキシトリチル基である。JおよびKのうち少なくとも一方がジメトキシトリチルである式Ⅱの化合物は、この基の除去に際して色が変化するので有利であろう。JおよびKがジメトキシトリチル基を表わす場合、これは水性の酸、たとえば水性トリフルオル酢酸もしくは水性酢酸、好ましくは水性酢酸、

(19)

基の双方として作用しうるであろう。この種の基にはたとえばメチル、2-シアノエチル、2-クロルフェニル、2,2,2-トリハロ-1,1-ジメチル-エチル、5-クロルキノリン-8-イル、2-メチルチオエチル基、または2-フェニルチオエチル基であり、ここでフェニル環はたとえばハロゲン原子、たとえば塩素原子または NO_2 から選ばれる置換基を保有してもよい。一般にR^aはメチルまたは2-シアノエチルを表わすであろう。

R^aが水素原子である式Ⅱの化合物を目的とする場合、それ自体既知の方法により、たとえば前記の式Ⅰの化合物の製造に際し示した方法により、ホスフェート保護基を除去することができる。

式ⅡまたはI^aの化合物中のZ'は保護されていないか、または保護された形である。Z'が意味するヌクレオチド配列の長さは、たとえばDNA合成装置において構成されうる配列の長さによつて制限されるにすぎないことは認識されるであろう。ヌクレオチド150個まで、たとえばヌクレ

(21)

または水性鉄酸、たとえば水性塩酸で処理することにより除去するのが好都合であろう。JおよびKがテトラヒドロピラニル基を表わす場合、これは水性の酸、たとえば水性鉄酸、たとえば水性塩酸で処理することにより除去するのが好都合であろう。

JおよびKのうち一方のみが保護基を表わし、他方は水素原子を表わすことが好都合である。

Xが先に定義された式N-R^bの基以外のものである式Ⅲの化合物を用いることが有利である。Xが-CONH-または-NHCONH-である場合、普通はnは4である。Xは好ましくは直接結合または基-O-P(O)(OR^c)-O-である。従つてたとえばXが直接結合であり、nが5であり、rが0であるか、またはXが-O-P(O)(OR^c)-O-であり、nが5であり、rが8である式Ⅲの化合物が用いられる。

R^cがホスフェート保護基(以下R^bと呼ぶ)を表わす式Ⅲの化合物を用いる場合、この基は一般にホスフェート保護基およびホスフィット保護

(20)

オチド100個までのポリヌクレオチド配列が製造されるであろう。一般にZ'はヌクレオチド単位6~30個、好都合にはヌクレオチド単位12~25個のオリゴヌクレオチド配列を表わす。オリゴヌクレオチド配列をたとえば遺伝的障害の検出に用いたい場合、オリゴヌクレオチド配列は好ましくはヌクレオチド単位17~20個である。従つて本発明はたとえば米国特許第4,683,195号および第4,683,202号明細書に記載されたPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法に用いられるオリゴヌクレオチド型プライマーの製造において関心がもたれる。

ヌクレオチド配列が保護された形である場合、各ヌクレオチド単位がヌクレオチド配列の糖-ホスフェート主鎖のホスフェート基に対するホスフェート保護基を保有するであろう。この種の保護基については文献中に十分に論じられている(N.D.シンハ(Sinha)ら、Nucleic Acids Research(1984), 12, p 4539, J.L.フーレイ(Fourrey)およびJ.バレンタ

(22)

(Varonnes)、*Tetrahedron Letters* (1984) 25, 4511-4514またはE. オーツカ (Ohtsuka)ら、*Nucleic Acids Research*、1982、10, 6553-6570)。さらに、適宜なホスフエート保護基はヌクレオチド化学者にとつて自明であり、たとえば先にR⁶に関連して記載したホスフエート保護基、たとえばメチルまたは2-シアノエチルが含まれる。さらにこのヌクレオチド配列には通常のヌクレオシドである(デオキシ)シチジン、(デオキシ)アデノシン、(デオキシ)グアノシン、およびチミジンもしくは(デオキシ)ウリジンのうちいずれか一方、ならびに上記の通常のヌクレオシドのうち1種と塩基対合しうる塩基修飾ヌクレオシドが含まれてもよい。この種の塩基修飾ヌクレオシドには(デオキシ)イノシンおよび(デオキシ)8-アザグアノシンが含まれる。適宜、ヌクレオチド配列中に存在するヌクレオチドの塩基部分が保護基を保有してもよい。従つてたとえばアデニン、シトシンおよびグアニン中のアミン置換基が適宜な

(23)

学者に自明である。

ホスフエート保護基がスルフイド結合を含む場合、この結合は除去される前に酸化して、対応するスルホキシドまたはスルホンにすることが好都合であろう。

前記の保護基JおよびKについて概説したように、脱保護を行う条件は必然的にホスフエート、ヌクレオチドのホスフエート、および塩基の各保護基の性質に依存するであろう。

たとえばホスフエート、および/またはヌクレオチドのホスフエートの保護基がメチル基である場合、これを求核試薬、たとえばエノラートイオン、好ましくはチオエノラートイオン、または塩基、たとえば水酸化アンモニウムで処理することによつて好都合に除去でき；上記の保護基が2-シアノエチル基である場合、これは先に例示した塩基で処理することができる。

ヌクレオチド配列は所望により支持体、たとえば固体支持体、たとえば制御細孔ガラス製支持体に結合していくてもよい。ヌクレオチド配列を支持

(25)

保護基を保有してもよく、この種の保護基については文献中に十分に論じられている（たとえばE. オーツカ (Ohtsuka)ら、*Nucleic Acids Research* (1982)、10, 6553-6570）。

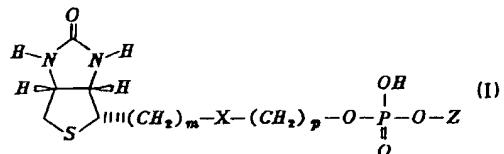
さらに、適宜な塩基保護基はヌクレオチド化学者に自明であり、特にイソブチリルおよびベンゾイルが含まれる。イソブチリル基はグアニンに対する保護基として特に好適であり、ベンゾイル基はシトシンおよびアデニンに対する保護基として特に好適である。従つて保護された塩基にはたとえばN⁴-ベンゾイルシトシン、N⁶-ベンゾイルアデニンおよびN²-イソブチリルグアニンが含まれる。すべての塩基が保護を要するわけではなく、たとえばチミンおよびウラシルが保護基を必要としないことは認識されるであろう。

上記のホスフエート保護基、ヌクレオチドのホスフエート保護基、および塩基保護基はすべて文献中に十分に立証された方法に従つて除去することができる。この種の脱保護法はヌクレオチド化

(24)

体から開裂させる方法は文献中に十分に立証されており、また実際にヌクレオチド-支持体の開裂法はヌクレオチド化学者に自明である。上記の開裂および脱保護のために選ばれる条件は等しいか、または類似しており、従つてこれらの操作が同時に進行する可能性のあることは認められる。

式Ⅱの化合物の脱保護によつて式I



の化合物ではなく式Ⅰaの化合物が生成した場合、所望により保護基をたとえばそれ自体既知の方法により除去し、および/または式Ⅰaの化合物が支持体に結合している場合には所望によりこの化合物をたとえばそれ自体既知の方法により支持体から開裂させることができ、これによつて式Ⅰの化合物が得られる。

式ⅡまたはⅠaの化合物の保護基の除去、およ

(26)

び支持体からの開裂はいかなる好都合な順序で行うこともでき、これは個々の場合に選ばれる個々の条件に依存するであろうということは認識されるであろう。

従つてたとえば(a)支持体に結合した完全に保護された化合物を、ホスフェート保護基を除去しかつスクレオチド配列を支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を次いで塩基保護基が除去される脱保護工程によりさらに処理し、こうして得られた化合物を最後に保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいは(b)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでホスフェート保護基を除去しかつスクレオチド配列を支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を最後に塩基保護基が除去される脱保護工程によりさらに処理すると、式Iの化合物が生成する。

(27)

Kが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでさらにホスフェート保護基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでスクレオチド配列が支持体から開裂する開裂反応により処理し、得られた化合物を最後に塩基保護基が除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいはたとえば(c)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物をホスフェート基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いで塩基保護基を除去しかつスクレオチド配列をその支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を最後に保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいはたとえば(d)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物をスクレオチド配列を支持体か

(29)

あるいはたとえば(e)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物をホスフェート保護基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を次いでスクレオチドがその支持体から開裂する開裂反応により処理し、こうして得られた化合物を次いで塩基保護基が除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を最後に保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

あるいは(f)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を、ホスフェート保護基を除去しかつスクレオチド配列を支持体から開裂させる反応により処理し、こうして得られた化合物を次いで保護基Jおよび/またはKが除去される脱保護工程により処理し、こうして得られた化合物を最後に塩基保護基が除去される脱保護工程により処理すると、式Iの化合物が得られる。

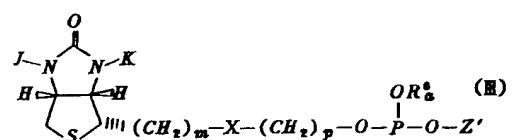
あるいはたとえば(g)支持体に結合した完全に保護された式IIの化合物を保護基Jおよび/または

(28)

ら開裂させかつホスフェート保護基および塩基保護基を除去する反応により処理する。

式IIまたはIの化合物の保護基を除去し、これらを支持体から開裂させるための順序は特に上記に概説した順序(a)である。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、前述式IIの化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、対応する式III



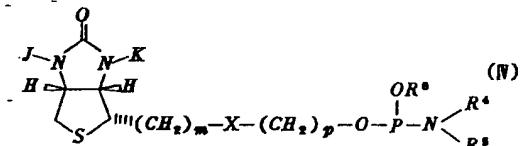
[式中、m、n、J、K、Z'、XおよびR_a^βは上記において定めたものである]の化合物またはそれらのイソ同族体を酸化することよりなる。

上記の酸化反応に用いられるホスフィット酸化剤は当業者に知られており、漂白剤；過酸たとえば過安息香酸、次亜塩素酸塩たとえば次亜塩素酸ナトリウム、過マンガン酸塩たとえば過マンガ酸カリウム；過酸化物、たとえばビス(トリメチ

(30)

ルシリル)ペルオキシド; またはヨウ素、好ましくは水性ヨウ素から選ぶことが好都合である。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、前記式Ⅲ〔上記において定めたとおり〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅳ

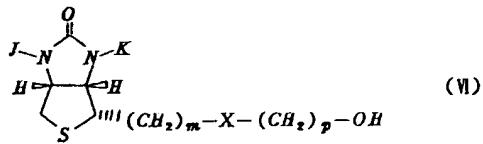


(式中、J、K、m、pおよびXは上記において定めたものであり、R⁴およびR⁵は同一でも異なるてもよく、それぞれC₁-10の直鎖もしくは分枝鎖アルキル基、好ましくはメチルもしくはイソブロビルであるか、またはR⁴とR⁵はそれらの間にある窒素原子と共に、異種原子1、2、3または4個を含む5~7員複素環を表わし、窒素原子のはかに存在する異種原子は酸素、窒素およびイオウから選ばれ、R⁵は上記において定めたR⁶に對応するが、ただし水素原子以外のものである]

(31)

列を支持体に結合させるために、およびこれを支持体から離脱させるために、また前記の結合反応のために適切な条件を選ぶことができるであろう。式Ⅳの化合物を結合させるのに好都合な位置はオリゴヌクレオチド配列の5'末端である。ヌクレオチド配列を結合反応の前に支持体に結合させることができが好都合である。この結合反応は有利にはヌクレオチドの自動合成用装置、たとえばDNA合成装置により行われる。結合反応はたとえば1回または2回反復することができる。結合反応は所望により1種または2種以上の有機溶剤、たとえばジクロルエタンもしくはアセトニトリルまたはそれらの混合物の存在下で行うことができる。

本発明の他の独立した観点によれば、前記式Ⅳ〔上記において定めたとおり〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、式Ⅴ



(33)

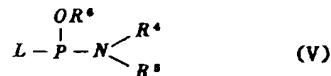
の化合物またはそれらのイソ同族体を、上記において定めた基Z'のヌクレオチド配列に対応するが、ただし式Ⅳの化合物への付着位置においては保護されておらず、このためこの位置での結合が可能である式Z'のヌクレオチド配列と結合させ、これにより式Ⅲの化合物またはそれらのイソ同族体を得ることよりなる方法が提供される。R⁶が水素原子である式Ⅲの化合物を目的とする場合、ホスフェート保護基をそれ自体既知の方法により除去することができる。

R⁶およびR⁷がそれらの間にある窒素原子と共に複素環を表わす式Ⅳの化合物を用いる場合、環は飽和されているか、またはより好ましくないが不飽和であつてもよく、5個または6個の環員子、たとえば6個の環員子を有することが好都合である。複素環は2個を上回る異種原子を含まないことが好都合であり、この種の環はたとえばビペリジノおよびモルホリノ基、好ましくはモルホリノ基、たとえば4-モルホリノ基である。

熟練したヌクレオチド化学者はヌクレオチド配

(32)

〔式中、J、K、m、pおよびXは上記において定めたものである、ただしR⁶は水素を表わさない〕の化合物またはそれらのイソ同族体を式Ⅵ

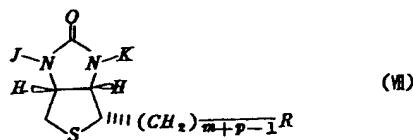


〔式中、R⁴、R⁵およびR⁶は上記において定めたものであり、Lは置換可能な基である〕の化合物と反応させ、これにより式Ⅳの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させることよりなる方法が提供される。

Lがハロゲン原子、特に塩素原子または臭素原子、殊に塩素原子である式VIの化合物を用いるのが好都合である。適切な反応条件は当業者に明らかであろう。反応は1種または2種以上の溶剤、たとえば非プロトン溶剤、たとえばエーテル、またはハロアルカン、たとえば塩化メチレンもしくは四塩化炭素、より有利にはジハロメタン系溶剤、たとえばジクロルメタンの存在下で行うことが好都合である。

(34)

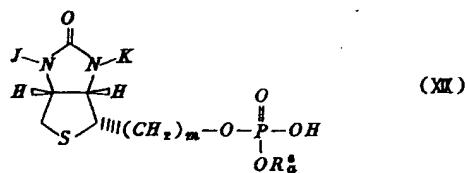
本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅵ〔式中、 X は直接結合を表わし、 J 、 K 、 m および p は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体であつて、対応する一般式Ⅶ



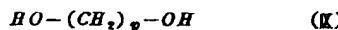
〔式中、 J 、 K 、 m および p は上記において定めたものであり、 R は対応するアルコール類に還元しうる基を表わす〕の化合物またはそれらのイソ同族体を還元し、これにより式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を生成させることよりなる方法が提供される。この還元は還元剤の存在下で好都合に行われる。適切な還元剤は当業者に自明であり、たとえば複合金属ハロゲン化物、たとえば水素化アルミニウムリチウム；またはジボラン、好都合には水素化アルミニウムリチウムが含まれる(H. C. ブラウン(Brown)およびS. クリシュー

(35)

(36)

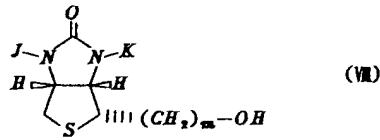


〔式中、 J 、 K 、 m および R' は上記において定めたものである〕のリン酸化(phosphorylated)ビオチノール誘導体またはそれらのイソ同族体を、一般式Ⅸ



〔式中、 p は上記において定めたものである〕の適宜なジオールと反応させ、これにより先に定めた式Ⅷの化合物またはそれらのイソ同族体を生成させることよりなる方法が提供される。

式Ⅸの化合物またはそのイソ同族体は一般式Ⅹ



(37)

ナムルフィー(Krishnamurphy)、Tetrahedron (1979)、35, p 567-607)。この還元は所望により1種または2種以上の溶剤、たとえば有機溶剤、たとえば非プロトン溶剤、特にテトラヒドロフラン(THF)の存在下で行われる。 R が特にカルボン酸無水物、イミダゾリドまたはそれらのエステル、たとえば脂肪族エステル、特にアルキルエステル、たとえば C_{1-6} アルキルエステル、たとえばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ベンチルおよびヘキシルエステル、好ましくはメチルエステルの残基である式Ⅶの化合物を用いるのが好都合である。

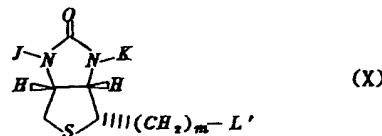
本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅹ〔式中、 X は $-O-P(O)(OR')-O-$ を表わし、 J 、 K 、 m および p および R' は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、一般式Ⅺ

〔式中、 J 、 K および m は上記において定めたものである〕の化合物またはそのイソ同族体をリン酸化剂(phosphorylating agent)と反応させることによつて得られる。好都合なリン酸化剤の選択により、 R' がホスフェート保護基 R^* (先に定めたものである)を表わす式Ⅺの化合物を製造しうることは認識されるであろう。好都合なリン酸化剤は当業者に自明であり、これには塩化ホスホリル、および(置換)アリールホスホロジ(1,2,4-トリアゾリド)、たとえば1,2,4-トリアゾールおよび2-クロルフェニルホスホロジクロリデートを塩基、たとえばピリジンの存在下で反応させることにより生成する2-クロルフェニルホスホロジ(1,2,4-トリアゾリド)が含まれる。リン酸化(phosphorylation)は1種または2種以上の有機溶剤の混合物、たとえば非プロトン溶剤、たとえばピリジンなどの存在下で行うことができる。 R^* が水素原子を表わす式Ⅹの化合物を、それ自体既知の方法により選択的に保護して、 R^* が先に定めた

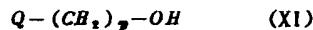
(38)

ホスフェート保護基 R^* を表わす対応する化合物を得ることができる。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅶ〔式中、 X は $-S-$ 、 $-O-$ または $N-R^*$ を表わし、 J 、 K 、 m 、 R^* および α は上記において定めたものである〕またはそれらのイソ同族体の製法であつて、一般式X



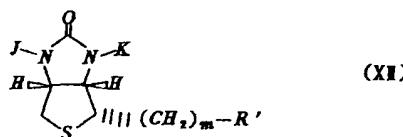
〔式中、 J 、 K および m は上記において定めたものであり、 L' は置換可能な基を表わす〕またはそれらのイソ同族体を一般式XI



〔式中、 α は上記において定めたものであり、 Q は陰イオンである水酸基、チオール基、または式 $N-R^*$ (R^* は上記において定めたものである)のアミン残基を表わす〕と反応させ、これにより先に定めた式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族

(39)

(40)



〔式中、 J 、 K および m は先に定めたものであり、 R' はカルボン酸残基またはその誘導体を表わす〕の化合物またはそれらのイソ同族体を式XIII



〔式中、 α は上記において定めたものである〕のヒドロキシアルキルアミンと反応させ、これにより先に定めた式Ⅶの化合物またはそれらのイソ同族体を生成させることよりなる方法が提供される。好都合なカルボン酸誘導体にはエステル、たとえば脂肪族エステル、たとえば C_1-C_6 アルキルエステル；無水物および酸塩化物が含まれる。好都合な反応条件は当業者に自明であろう。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅷ〔式中、 J 、 K 、 m および α は先に定めたものであり、 X は $-NHCONH-$ を表わす〕または

(41)

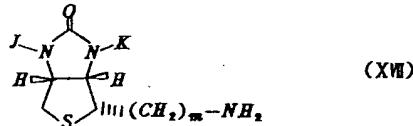
体を生成させることよりなる。

式 L' の好都合な置換可能な基は当業者に自明であり、これにはハロゲン原子、たとえば塩素原子または臭素原子、メシレートおよびトシレート残基、好都合にはトシレート残基が含まれる。この反応は1種または2種以上の有機溶剤の混合物たとえば非プロトン溶剤、たとえばジメチルホルムアミド(DMP)などの存在下で行うことができる。一般式Xの化合物は対応する式Ⅶのビオチニル誘導体からそれ自体既知の方法により製造することができる。たとえば置換可能な基 L' としてトシレート基を有する式Xの化合物を目的とする場合、これは対応する式Ⅶの化合物をハロゲン化トリル、たとえば塩化トリルと反応させることによって製造するのが好都合である。

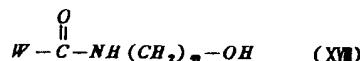
本発明の他の別個の独立した観点によれば、一般式Ⅸ〔式中、 J 、 K 、 m および α は先に定めたものであり、 X は $-CONH-$ を表わす〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、一般式XII

(40)

これらのイソ同族体であつて、一般式XIV



〔式中、 J 、 K および m は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体を一般式XV



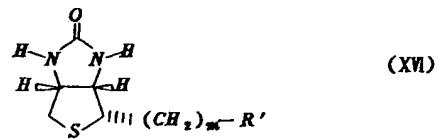
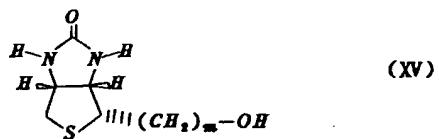
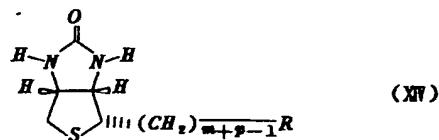
〔式中、 α は上記において定めたものであり、 W は置換可能な基を表わす〕の化合物と反応させ、これにより式Ⅸの化合物またはそれらの同族体を生成させることよりなる。好都合な置換可能な基は当業者に自明であり、これにはアリールオキシ基、たとえばフェニルオキシ基が含まれる。

一般式XVIの化合物は前記式XIIの化合物からそれ自体既知の方法により、たとえばクルチウス転位に基づく方法により得られる。一般式XVIの化合物は対応する式XV(αは先に定めたものであ

(42)

る)のアミンからそれ自体既知の方法により得られる。

本発明の他の別個の独立した観点によれば、前記式Ⅶ、ⅧまたはⅨ〔これらの式中、J、K、m、n、RおよびR'は上記において定めたものである〕の化合物またはそれらのイソ同族体の製法であつて、対応する一般式ⅩV、XVまたはXVI



(43)

(44)

の好都合な前駆物質はそれぞれ2,3-ジヒドロピランおよび2-メトキシ-2,3-ジヒドロピランである。選ばれた基Jおよび/またはKがジメトキシトリチル基である場合、その好都合な前駆物質はジメトキシトリチルクロリドまたはジメトキシトリチルプロミドである。

一般式Ⅶの化合物は当技術分野で知られている——たとえば欧州特許出願第86302750.4号(公開第202,758号)明細書を参照されたい——か、またはそれ自体既知の方法によりビオチン誘導体から製造できる。

前記一般式Ⅶ、ⅧおよびⅨの化合物は新規であり、これら一般式のものはそれぞれ本発明のさらに別個の観点をなす。式Ⅸの化合物も新規であり、本発明の他の特徴をなすと考えられる。この種の式Ⅸの化合物にはJまたはKのいずれもC₁₋₅アルキル、C₁₋₅アルケニル、アセチル、メトキシカルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない式Ⅷの化合物は本発明の他の特徴をなす。

[式中、J、K、m、n、RおよびR'は上記において定めたものである]の誘導体またはそれらのイソ同族体を式J'の化合物および/または式K'の化合物〔これらの化合物J'およびK'はそれぞれ上記において定めた基JおよびKの前駆物質である〕と反応させ、これにより式Ⅶ、ⅧまたはⅨの化合物またはそれらのイソ同族体を形成させることよりなる方法が提供される。好都合な反応条件は当業者に自明であろう。ここで“前駆物質(precursors)”という語は、それらと前記式Ⅷの化合物の反応によつて目的とする基Jおよび/またはKが導入されて、対応する式Ⅸの化合物が得られるべく選ばれた化合物を示すために用いられる。たとえば特に、選ばれた基Jおよび/またはKがテトラヒドロピラン残基、たとえばテトラヒドロピラン-2-イルまたは6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イルである場合、それら

カルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない化合物が含まれるであろう。

JまたはKのいずれもC₁₋₅アルキル、C₁₋₅アルケニル、アセチル、メトキシカルボニル、フェニル、ベンジルまたはベンゾイルを表わさない式Ⅷの化合物は本発明の他の特徴をなす。

格別な化合物群には、Xが直接結合であるか、nが5であるか、またはnが0であるか、またはXが-O-P(O)(OH)-O-であるか、またはnが8である前記各式のものが含まれる。より格別な化合物群には、Xが直接結合であり、nが5であり、かつnが0であるか、またはXが-O-P(O)(OH)-O-であり、かつnが8である前記各式の化合物が含まれる。

本発明は前記方法2種以上が順次配列したものからなる方法にも関する。好都合には上記方法のうち1種または2種以上がDNA合成装置において行われ、従つて本発明の他の特徴によれば、前記方法のうち少なくとも1種を行うべくプログラ

(45)

(46)

ムされたDNA合成装置が提供される。塩基保護基の除去法を除いて、式I、Ia、IIおよび/またはDNAの化合物の製法はDNA合成装置に用いるのに特に好適である。

本発明により製造されるビオチニル化オリゴヌクレオチド配列は、たとえばハイブリダイゼーションアッセイ法において相補的配列を検出するためのプローブとして、当技術分野において知られている方法により製造された誘導体と同様を様式で、好都合に使用できる。本発明により製造できる好都合なプローブは欧州特許出願公開第202,758号明細書に示されている。

本発明は以下の実施例により説明されるが、これらによつて限定されない。各例においてオリゴヌクレオチド配列インターフエロン α_2 -55は下記のものである。

AAGAAATACAGCCCCG

各例においてかつて内に示された文字A~Mは実施例の末尾の一覧表中の構造式を表わす。

(47)

ン

NBT—ニトロブルートラゾレウム

BCIP—5-ブロム-4-クロル-3-インドリルホスフェート

以下のものは商標である。

フラクトシル(*Fractosil*)、パーテイシル(*Partisil*) 10-SAX、ファイコール(*Ficoll*) 400,000、トライトン(*Triton*)-X-100、コア・バッファー(*Core Buffer*)、ノニデット(*Nonidet*) P40、ツウェーン(*Tween*)、C18- μ ポンダパック(*Bondapak*)

実施例 1.

ビオチノリルヒドロキシ[5'-(インターフエロン- α_2 -55)]ホスフィンオキシド(A)

塩酸(0.1N、600μL)を下記により得たヒドロキシ[5'-(インターフエロン- α_2 -55)]-N¹-(テトラヒドロ-2-ピラニル)ビオチノリルホスフィンオキシド(B)0.1μモルに添加し、混合物を22℃に45分間放置した。水酸化アンモニウム(比重0.91、126μL)を添加し、次

(49)

各例における各種試薬の成分は下記のとおりである。

PBS—150mM NaCl+10mM リン酸ナトリウム(pH 7.4)

SSC—0.15M NaCl+0.015M クエン酸ナトリウム

デンハルト(Denhardt's)試薬 0.02% BSA

0.02% ファイコール
400,000

0.02% PVP

下記の略号を用いた。

DMP—ジメチルホルムアミド

DNA—デオキシリボ核酸

PBS—リン酸塩緩衝食塩液

SDS—ドテシル硫酸ナトリウム

BSA—ウシ血清アルブミン

PVP—ポリビニルピロリデン

HEPES—(N-2-ヒドロキシエチル-N¹-2-エタノスルホン酸)

TRIS—トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタ

(48)

いでビオチニル化オリゴヌクレオチド誘導体(A)を二段階高圧液体クロマトグラフイー(HPLC)法により精製した(C.R.ニュートン(Newton)ら、*Anal.Biochem.* 1983, 129, p 222-30に記載)。

1回目のパーテイシル10-SAXイオン交換樹脂上におけるHPLC(緩衝液系用を使用)により、保持時間29.8分の最も長時間保持されたピークとしてビオチニル化オリゴヌクレオチド(A)を得た。等しい条件下で分析した場合、ビオチニル化オリゴヌクレオチド誘導体(B)は28.9分の保持時間を有し、母体オリゴヌクレオチド配列であるインターフエロン- α_2 -55(C)は28.6分の保持時間を有していた。

2回目の μ -ポンダパックC-18(10-4.5%、~~約10cm~~=40')においては20.0分の保持時間をもつ(A)を与える(B)および(C)は等しい条件下で分析した場合それぞれ24.0分および18分の保持時間を有していた。

出発物質として用いた保護されたビオチニル化

(50)

オリゴヌクレオチド(B)は以下により製造された。

a) N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチンメチルエステル
トルエン-4-スルホン酸・1水化物(11.4g)を新たに蒸留された2,3-ジヒドロ-4H-ピラシ(10.2g)およびD(+)ビオチンメチルエステル(3g)(E.A. バイエル(Bayer)およびM. ウィルチエツク(Wilchek), Methods of Biochemical Analysis, 26, p.1)のジクロルメタン(40mL)中の溶液に0°Cで搅拌下に添加した。混合物をこの温度で10分間、次いで22°Cで1.5時間搅拌した。この溶液を順次、水(50mL)、飽和炭酸水素ナトリウム溶液(50mL)および飽和ブライン溶液(50mL)で洗浄し、次いで無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、蒸発させた。残渣を最小量のジエチルエーテルに入れ、石油エーテル(沸点40~60°C)で摩碎処理して、 N^1 - (テトラヒドロピラニル)ビオチンメチルエステル1.8gを得た。触点120~122°、収率45%。

(51)

ウムを分解した。ブタン-1-オール(150mL)を添加したのち、混合物がわずかに酸性(pH 5.0)になるまで1N塩酸を添加した。水層を廃棄し、ブタノール溶液を飽和炭酸水素ナトリウム溶液(150mL)で2回、次いで飽和ブライン溶液(150mL)で2回洗浄した。水(150mL)をブタノール溶液に添加し、混合物を減圧下に40°Cで蒸発させた。残渣をシリカゲル(50g; メルクArt. 9385)のカラムにより、 CH_2Cl_2 : CH_3OH , 9:1(v/v)を溶離剤として用いて分画した。適宜な画分(シリカゲル上での薄層クロマトグラフィーによる指示に従う)を合わせたものから溶剤を蒸発させたのち、 N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノール(0.33g、収率70%)が油として得られた。質量イオン(M^+ =314)。

c) メトキシモルホリノ[N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノリル]ホスファイン(D)

クロル(メトキシ)モルホリノホスファイン

(53)

質量イオン(M^+ =342)、NMR δ($(CD_3)_2S=O$)、ブルーカーパーH 400MHz 6.85(1H, s, H-3); 4.80(1H, dxd, H-1'); 4.48(1H, m, H-6a); 4.10(1H, m, H-3a); 3.87(1H, dxd, H-5'); 3.40(1H, dxd, H-5'); 3.61(3H, s, OCH_3); 3.15(1H, m, H-4); 3.10(1H, d, H-6); 2.83(1H, dxd, H-6); 2.33(2H, t, 2xH-10); 1.9-1.3(12H, 複合m, 2xH-7, 2xH-8, 2xH-9; 2xH-2'; 2xH-3', 2xH-4')。

b) N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノール

N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチンメチルエステル(0.5g)の蒸留テトラヒドロピラン(25mL)中の溶液を水素化アルミニウムリチウム(0.27g)のテトラヒドロピラン(25mL)中の懸濁液に0°Cで窒素雰囲気下に滴加した。搅拌を30分間続ければ、次いで水:テトラヒドロピラン混合物1:1.9v/v(20mL)を慎重に添加することにより、過剰の水素化アルミニウムリチ

(52)

(0.13g)を5分間にわたって N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノール(0.2g)および N,N -ジイソプロピルエチルアミン(0.35g)の乾燥ジクロルメタン(5mL)中の溶液に0°Cで搅拌しながら窒素雰囲気下に添加した。反応混合物の温度を1時間にわたって22°Cに高め、次いで混合物を蒸発させた。残留する油をジクロルメタンに溶解し、シリカゲル(50g; メルクArt. 9385)のカラムによりトリエチルアミン:酢酸エチル(7:3v/v)を溶離剤として用いて分画した。適宜な画分を合わせたものから溶剤を蒸発させて、メトキシモルホリノ[N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノリル]ホスファイン(D)(50mg、収率17%)を得た。質量イオン($M+H$) $^+=462$ 。

d) ヒドロキシ[5'- (インターフエロン- α_2 -5')] N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノリルホスファインオキシド(B)
インターフエロン- α_2 遺伝子合成において配列55として知られている完全に保護されたオリゴ

(54)

デオキシリボヌクレオチド配列 (C) [M.D. エッジ (Edge) ら、 *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11, 6419-6435] に記載) 一制御細孔ガラス製支持体に結合一をアプライド。バイオシステムズ 380A・DNA 合成装置により、下記のものから製造した。5'-ジメトキシトリル-N²-イソブチリル-2'-デオキシグアノシン 0.2 μモル一制御細孔ガラス (細孔寸法 500 Å ; 粒径 1.25~1.74 ミクロン) に結合; 装填量 2.0~5.0 μモル / g (BDH 社) 、ならびに 5'-ジメトキシトリル-N²-ベンゾイル-2'-デオキシグアノシン、5'-ジメトキシトリル-N²-ベンゾイル-2'-デオキシシチジン、5'-ジメトキシトリル-N²-イソブチリル-2'-デオキシグアノシンおよび 5'-ジメトキシトリルチミジンの 2-シアノエチル-N₂-ジイソプロピルアミノホスホルアミダイト (BDHケミカルズ社) 。

[あるいは完全に保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチド配列はアトキンソン (Atkinson) およびスマス (Smith) が " オリゴヌクレオチド (55)]

(55)

トキシトリル基を除去した。

(2) 上記ホスフイン (D) を上記(1)のオリゴヌクレオチド配列に 20 秒間および 5 秒間の 2 回、結合させた。次いで、こうして得た完全に保護された [5'- (インターフエロン - α₂ - 55)] メトキシ - N¹ - (テトラヒドロビラン - 2 - イル) ピオチノリルホスフイン (E) をヨウ素酸化して、対応するホスフェート (F) を得た。次いでこのホスフェート誘導体を部分的に脱保護してすべてのホスフェート保護基を除去し、オリゴヌクレオチド配列を制御細孔ガラス製支持体から開裂させた。両操作とも適宜な量のチオフェノラートイオン、次いで水酸化アンモニウム (比重 0.91) を用いて DNA 合成装置により自動的に行われた。得られた水酸化アンモニウム溶液を次いで 55 °C に 6 時間加熱し、次いで蒸発させ、ヒドロキシ [5'-(インターフエロン - α₂ - 55) - N¹ - (テトラヒドロビラン - 2 - イル) ピオチノリルホスフインオキシド (B) を含有する残渣をエタノール / 水 (3:7 v/v, 1.5 mL) に溶解した。次いでこの溶液を

(57)

の合成、実用的方法" (編者、 M.J. ゲイト (Gait) 、 IRL プレス、ワシントン DC オックスフォード、 p.35-81) に記載した手動による方法で製造することができる。] メトキシモルホリノ [N¹ - (テトラヒドロビラン - 2 - イル) ピオチノリル] ホスフイン (D) 1.2.6 mg の 1, 2 - ジクロルエタン : アセトニトリル (2:3 v/v) 0.6 mL 中の溶液をアプライド。バイオシステムズ 380A DNA 合成装置による改良された結合反応における通常のヌクレオシドホスホルアミダイトの代わりに使用し、完全に保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチド配列インターフエロン - α₂ - 55 (C) の 5' 末端に付加させて、オリゴデオキシリボヌクレオチド配列が前記のように完全に保護された [5'- (インターフエロン - α₂ - 55)] メトキシ - N¹ - (テトラヒドロビラン - 2 - イル) ピオチノリルホスフイン (E) を得た。この改良された結合反応は以下の工程からなつていた。

(1) 完全に保護された配列から 1, 2 - ジクロルメタン中の 3% トリクロル酢酸を用いて 5'-ジメ

(56)

そのまま後続の脱保護工程に用いた。

実施例 2.

ピオチノリルヒドロキシ [5'- (インターフエロン - α₂ - 55)] ホスフインオキシド (A)

下記により得られる N¹ - (4, 4'-ジメトキシトリル) ピオチノリルヒドロキシ [5'- (インターフエロン - α₂ - 55)] ホスフインオキシド (C) 0.1 μモルを、ピリジン 4 滴を含有する 8.0% 酢酸 2 mL により室温で 20 分間処理した。酢酸を減圧下での蒸発、ならびに水 (2 mL) および β - ブタノール (0.5 mL) との共沸により除去した。粗のオリゴヌクレオチド (A) を 1.5 mL の 1.5% エタノール、 H₂O に入れ、実施例 1 に示した二段階高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。

1 回目のパーティシル 10-SAX 上における HPLC (6.0% ホルムアミド、 0~100% 、 1-2-7-6m (50') において、直線濃度勾配) により、母体オリゴヌクレオチド (C) の 1.6 分間と比較して最も長時間保持された、保持時間 1.7 分のビー

(58)

クとして表題のビオチニル化オリゴヌクレオチド(A)を得た。2回目の μ -ポンダパック C-18 上でのHPLCは、それぞれ保持時間31.0および28.8分を与えた。 μ -ポンダパック(10-100%、約100ml(40')において)を用いて反復した場合、それぞれ29.3および14.4分が記録された。

出発物質として用いた保護されたビオチニル化オリゴヌクレオチド(G)は下記により製造された。

a) N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチンメチルエステル

無水D(+)-ビオチンメチルエステル(5.0g; 無水ビリジンとの共沸蒸留により乾燥)および4,4'-ジメトキシトリルクロリド(7.25g)の無水ビリジン(12.5ml)中の溶液を22°Cで1時間攪拌した。メタノール(20ml)を添加し、混合物を蒸発させた。残渣を塩化メチレン(300ml)に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液(2×200ml)および飽和ブライン溶液(2×200ml)で順次洗浄し、次いで無水硫酸マグネシウム

(59)

%)。

b) N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチノール

N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチンメチルエステル4.0gの乾燥蒸留テトラヒドロフラン(300ml)中の溶液をテトラヒドロフラン(130ml)中の水素化アルミニウムリチウム(1.3g)の懸濁液に22°Cで滴加した。搅拌を20分間続け、次いで水:テトラヒドロフラン混合物(1.19v/v; 100ml)を慎重に添加することにより、過剰の水素化アルミニウムリチウムを分解した。ブタン-1-オール(500ml)を添加し、混合物を飽和硫酸ナトリウム溶液(100ml)および水(100ml)で順次洗浄し、次いで減圧下に40°Cで蒸発させた。残渣する褐色の油を塩化メチレン(80ml)に溶解し、ウォーターズ・プレプ500HPLC 1カートリッジシステムにより、メタノール:塩化メチレン(1.9v/v)を溶離剤として用いて分画した。適宜な画分(150ml; 5~8)を蒸発させたのち、 N^1 -

(61)

で乾燥させ、蒸発させた。残留する油を塩化メチレン(80ml)に溶解し、ウォーターズ・プレプ500HPLC 2カートリッジシステム(ウォーターズ・アソシエーツ社)により、塩化メチレン(8L)中の0~8%メタノールの濃度勾配を用いて精製した。適宜な画分(300ml; 14~16)を蒸発させたのち、 N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチンメチルエステルを黃金色の固体として得た。

質量イオン($M^+ = 560$, NMR δ(CDCls, 200MHz) 7.22(9H, m, 芳香族プロトン); 6.83(4H, d, 芳香族プロトン); 4.94(1H, 幅広いs, NH); 4.35(2H, m, H_{3a}, H_{6a}); 3.78(3H, s, メトキシプロトン); 3.68(3H, s, メチルエステルプロトン); 3.11(1H, m, H₄); 2.47(1H, dxd, J_{gem}=13Hz, J_{16,1a}=1.7Hz, H₆); 2.29(2H, t, J_{9,10}=6.7Hz, 2xH₁₀); 2.27(1H, dxd, J_{gem}=13Hz, J_{6,6a}=5.3Hz, H₆); 1.5(6H, 複合m, 2xH₈, 2xH, 2xH₉)。 (4.4g; 収率40%)

(60)

(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチノールを褐色の油として得た。

質量イオン($M^+ = 532$)、(3.02g; 収率80%)。

c) [N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチノリル]メトキシモルホリノホスファイン(H)

実施例1、c部において採用したと同様な方法で、ただし N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチノールを N^1 -(テトラヒドロピラン-2-イル)ビオチノールの代わりに用いて、[N^1 -(4, 4'-ジメトキシトリル)ビオチノリル]メトキシモルホリノホスファイン(H)を無色の油として44%の収率で得た。NMRデータは以下のとおりであった。(CDCl₃, 200MHz) 7.22(9H, m, 芳香族プロトン); 6.80(4H, d, 芳香族プロトン)、4.92(1H, s, NH); 4.33(2H, m, H_{3a}, H_{6a}); 3.8(3H, s, メトキシプロトン); 3.68(1H, m, H₄); 3.6(2H, t, J_{10,11}=4.2Hz, 2xH₁₁); 3.45

(62)

(3H, d, J_p , $OCH_3 = 11.7 Hz$, $P - OCH_3$) ;
3.12 (4H, m, モルホリノプロトン) ; 2.47
(1H, dxd, $J_{gem} = 13.3 Hz$, $J_{6,6a} = 15 Hz$,
 H_6) ; 2.26 (1H, dxd, $J_{gem} = 11.7 Hz$,
 $J_{6,6a} = 5.0 Hz$, H_6) ; 1.52 (8H, 複合m, 2x
 H_7 , 2x H_8 , 2x H_9 , 2x H_{10})。

d) [N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ピオ
チノリル] ヒドロキシ [5'- (インターフエ
ロン- α_2 - 5.5) ホスフインオキシド (G)

細孔ガラス製支持体に結合した完全に保護
されたインターフエロン- α_2 - 5.5配列 (C)を実
施例 1、(d)部の記載に従つて製造した。上記(d)で
得た [N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ピオ
チノリル] メトキシモルホリノホスフイン (H)を
アブライド・バイオシステムズ合成装置小規模
合成プログラム abibe 103、結合工程 3×100
秒(普通法 1×30 秒)、キャッピング工程なし、
続いてホスフイット基をヨウ素酸化してホスフエ
ート (K)を得た。ホスフエート保護基を除去し、
オリゴヌクレオチドを合成装置上で水酸化アンモ
ニウム(比重 0.91)により支持体から開裂させ、
次いで比重 0.910 のアンモニアで処理すること
により塩基保護基を除去し($50^\circ C$ 、4~5時間)、
表題のホスフインオキシド (G)を得た。これをそ
のまま次の工程に用いた。

(63)

実施例 3.

ビオチノリルヒドロキシ [5'- (インターフエ
ロン- α_2 - 5.5)] ホスフインオキシド (A)

後記により得られるヒドロキシ [5'- (インターフエ
ロン- α_2 - 5.5) - N^1 - (6-メトキシテ
トラヒドロピラン- 2-イル) ピオチノリルホス
フインオキシド (L)] を塩酸 ($0.1 N$ 、 $600 \mu L$)
で処理し、混合物を $22^\circ C$ に 45 分間放置した。
水酸化アンモニウム(比重 0.91、 $126 \mu L$)を
添加し、表題のビオチニル化オリゴヌクレオチド
(A)を次いで実施例 1 に示した高圧液体クロマト
グラフィー (HPLC) により精製した。

1回目のパーテイシル 10-SAX による
HPLC (60% ホルムアミド、 $0-100\%$,
~~1-2-7 cm~~ (50% において、直線濃度勾配) により
表題のビオチニル化オリゴヌクレオチド (A)を母
体オリゴヌクレオチド (C)の 2.1.5 分と比較して
最も長時間保持される、保持時間 2.2.2 分のピー
クとして得た。2回目のμ-ポンダパック C -
18 による HPLC ($10-40\%$ 、~~約 1-0-2 cm~~

(65)

された N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル) ピオ
チノリル [5'- (インターフエロン- α_2 - 5.5)]
メトキシホスフイン (J)を得た。

この改良された結合反応は下記の工程からなつ
ていた。[N^1 - (4, 4'-ジメトキシトリチル)
ピオチノリル] メトキシモルホリノホスフイン
(H) ($100 \mu g$)を無水 CH_3CN と 3 回共沸させ、
次いで 1 : 2 - ジクロルエタン ($333 \mu L$) ;
 CH_3CN ($222 \mu L$) に溶解した。

アブライド・バイオシステムズ合成装置小規模
合成プログラム abibe 103、結合工程 3×100
秒(普通法 1×30 秒)、キャッピング工程なし、
続いてホスフイット基をヨウ素酸化してホスフエ
ート (K)を得た。ホスフエート保護基を除去し、
オリゴヌクレオチドを合成装置上で水酸化アンモ
ニウム(比重 0.91)により支持体から開裂させ、
次いで比重 0.910 のアンモニアで処理すること
により塩基保護基を除去し($50^\circ C$ 、4~5時間)、
表題のホスフインオキシド (G)を得た。これをそ
のまま次の工程に用いた。

(64)

($40^\circ C$ において) はそれぞれ 1.7.5 および 1.6.0
分の保持時間を与えた。

出発物質として用いて保護されたビオチニル化
オリゴヌクレオチドは下記により製造された。

a) N^1 - (6-メトキシテトラヒドロピラン- 2
-イル) ピオチルメチルエステル

実施例 1、(a)部に記載した方法を、2, 3-ジ
ヒドロ-4H-ピランの代わりに 2, 3-ジヒド
ロ-2-メトキシ-4H-ピランを用いて反復し
た。粗生成物をフラツシユシリカゲルクロマトグ
ラフィー(メルク・キーゼルゲル 60, Aris
9385)により、塩化メチレン:メタノール
(94 : 6 v/v)を溶離剤として用いて精製した。
適宜な画分から溶剤を除去したのち表題の化合物
を 2.2% の収率で得た。NMR データは以下のと
おりであった。

δ ($CDCl_3$, $300 MHz$) 5.78 および 5.63 (1H,
2s, NH プロトン) ; 5.46 (1H, dxd, メトキシ
THP プロトン) ; 4.77 (1H, br.d, メトキシ
THP プロトン) ; 4.48 (1H, 複合m,

(66)

$H_{3\alpha}$) ; 4.22 (1H, 複合 m , $H_{6\alpha}$) ; 3.68 (3H, δ , メチルエステルプロトン) ; 3.68 (3H, δ , メトキシTHPプロトン) ; 3.44 (3H, δ , メトキシTHPプロトン) ; 3.18 (1H, 複合 m , H_4) ; 2.86 (2H, 複合 m , 2 $\times H_6$) ; 2.32 (2H, t , 2 $\times H_{10}$) ; 1.58 (12H, m , メトキシTHPプロトンおよび2 $\times H_7$, 2 $\times H_8$ および2 $\times H_9$)。

b) N^1 - (6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル) ピオチノール

実施例1、(b)部に記載した方法を、 N^1 - (テトラヒドロピラン-2-イル) ピオチンメチルエステルの代わりに N^1 - (6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル) ピオチンメチルエステルを用いて反復して表題の化合物を42%の収率で得た。質量イオン ($M+H$)⁺ = 345。

c) メトキシ [N^1 - (6-メトキシテトラヒドロピラン-2-イル) ピオチノリル] モルホリノホスファイン (M)

実施例1、(c)部に記載の方法を、 N^1 - (テトラ

(67)

[5'- (インターフエロン - α_2 - 55)] メトキシ - N^1 - (6 - メトキシテトラヒドロピラン - 2 - イル) ピオチノリルホスファイン (N) を得た。改良された結合反応は以下の工程からなつていた。

メトキシ [N^1 - (6 - メトキシテトラヒドロピラン - 2 - イル) ピオチノリル] モルホリノホスファイン (M) (7.8mg) を無水 CH_3CN と3回共沸させ、次いで1, 2-ジクロルエタン (360 μL) : CH_3CN (240 μL) 中溶解した。

アブライド・バイオシステムズ合成装置小規模合成プログラム abibel 03、結合工程 3×100秒 (普通法 1×30秒)、キヤツピング工程なし、続いてホスファイト基をホスフェートにヨウ素酸化 (P)。ホスフェート保護基を除去し、オリゴヌクレオチドを合成装置上で水酸化アンモニウム (比重 0.91) により支持体から開裂させ、次いで比重 0.910 のアンモニアで処理することにより塩基保護基を除去し (50℃、4~5時間)、表題のホスファインオキシド (L) を得た。次いで 1.5mL の 1.5% $EtOH$, H_2O 中に入れ、これをそ

(69)

ヒドロビラン-2-イル) ピオチノールの代わりに N^1 - (6 - メトキシテトラヒドロピラン - 2 - イル) ピオチノールを用い、溶離剤としてトリエチルアミン: 酢酸エチル (7 : 3, v/v) の代わりにトリエチルアミン: 酢酸エチル (4 : 1, v/v) を用いて、表題の化合物 (M) を20%の収率で得た。質量イオン ($M+H$)⁺ = 492。

d) ヒドロキシ [5 - (インターフエロン - α_2 - 55)] - N^1 - (6 - メトキシテトラヒドロピラン - 2 - イル) ピオチノリルホスファインオキシド (L)

前記において製造された、創御細孔ガラス製支持体に結合した完全に保護されたインターフエロン - α_2 - 55 配列をアブライド・バイオシステムズ 380A-DNA 合成装置による改良された結合反応における通常のヌクレオチドホスホルアミダイトの代わりに使用し、オリゴデオキシリボヌクレオチド配列インターフエロン - α_2 - 55 (C) の 5'末端に付加させて、前記のようにオリゴデオキシリボヌクレオチド配列が完全に保護された

(68)

のまま次の工程に用いた。

本発明のピオチニル化オリゴヌクレオチドのアビシン-アガロース結合法は下記により示される。緩衝液 (PBS, 0.1% ツウイーン 20) 0.5mL 中のピオチニル化オリゴヌクレオチドを、アビシン 7.4 単位を含むアビシン-アガロース (シグマ・ケミカル・カンパニー) のカラム (0.2mL) に添加した。このカラムを PBS, 0.1% ツウイーンで洗浄し、画分 (0.5mL) を採取した。母体オリゴヌクレオチド配列インターフエロン - α_2 - 55 (C) に遅滞なくカラムを通過した。

a) 実施例2で製造したピオチニル化オリゴヌクレオチド (A) (0.43 OD₂₆₀ 単位) の緩衝液中の溶液をアビシン-アガロースカラムに施した。合計 0.06 OD₂₆₀ 単位がカラムから回収された。従つて保持された (A) の割合は 8.6% であつた。

b) 実施例3で製造した (A) の緩衝液中の溶液 (0.25 OD₂₆₀ 単位) をアビシン-アガロースカラムに施した。合計 0.041 OD₂₆₀ 単位がカラムから回収された。従つて保持された (A) の割

—958—

(70)

合は 8.4 % であつた。

c) 保護されたビオチニル化オリゴヌクレオチド (*L*) の緩衝液中の溶液 (0.294 OD₂₆₀ 単位) をカラムに施した。合計 0.222 OD₂₆₀ 単位がカラムから回収された。従つて保持された (*L*) の割合は 2.4 % であつた。

d) 実施例 1 で製造した (*A*) の緩衝液 (0.5 ml) 中の溶液 (0.42 OD₂₆₀ 単位) を前記に従つてアビシン-アガロースカラム (0.55 ml; アビシン 2.1 単位) に施した。合計 0.076 OD₂₆₀ 単位がカラムから回収された。従つて保持された (*A*) の割合は 8.2 % であつた。

ハイブリダイゼーション試験例

プラスミド 1205 (α_2 インターフエロン遺伝子配列を含む) および *P₆* (*P₆*, α_2 インターフエロン同族体の遺伝子配列を含む) (たとえば欧州特許出願公開第 202758 号明細書を参照されたい) の系列希釈液をニトロセルロース (シュライヘル・アンド・シュル、BA85-SB) 上にシユライヘル・シュル・ミニフォールド II IC スポット

(71)

れた。

一夜ハイブリダイゼーションしたのちフィルターを室温で 6 × SSC、0.6 % ピロリン酸ナトリウム、2 mM リン酸ナトリウム、pH 7 中において 2 回洗浄し (各洗浄は 5 分間続けられた)、次いで同一緩衝液中において 1 回、40 °C で 3 分間洗浄した。ハイブリダイズしたプローブのスポットを *BRL-DNA* 検出キット (カタログ #82395 A) により可視状態にした。要約すると、フィルターにつき下記のインキュベーションを行つた。

1. 室温、1 分間、0.1 M トリス-HCl pH 7.5、0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.05 % (v/v) トライトン X-100 中 (緩衝液 1)
2. 37 °C、20 分間、緩衝液 1 中の 3 % (v/v) BSA (緩衝液 2)
3. 室温、10 分間、2 μg/ml のストレプトアビシンを含有する緩衝液 1 中 (溶液約 3 ml / 100 cm² ニトロセルロース)。
4. 緩衝液 1 中で 3 分間の室温洗浄。
5. 4と同じ。

(73)

トした (第 1 スポット 1 μg、以下は 3 倍の希釈液)。スポットする前に各プラスミド希釈液は 300 μl の 0.2 M-NaOH, 7 × SSC, 5.6 mM トリス HCl, pH 7.4 中で 100 °C において 10 分間アルカリ変性され、次いで氷浴中で冷却され、7.0 μl の 1 M トリス HCl, pH 7.0 の添加により中和された。この DNA はニトロセルロースを 80 °C で 2 時間、真空下にペーリングすることにより固定化された。

フィルターは 5 × デンハルト試薬、5 × SSC、5.0 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0、1 % グリシン、0.1 % SDS、100 μg/ml 音波処理し、煮沸したニシン精液 DNA 中で予備ハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションは室温で一夜、5 × SSC、0.5 % ノニテクト P40 (BDH56009)、250 μg/ml tRNA (シグマ・タイプ X-5、R0128) 中で、オリゴヌクレオチドが 50 倍モル過剰に存在する状態において行われた。予備ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションはシールしたプラスチックバッグ中で行わ

(72)

6. 5と同じ。

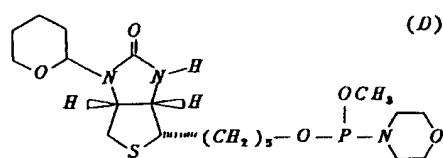
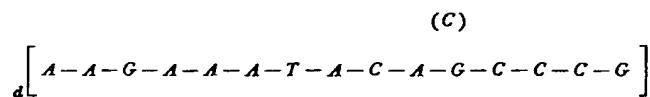
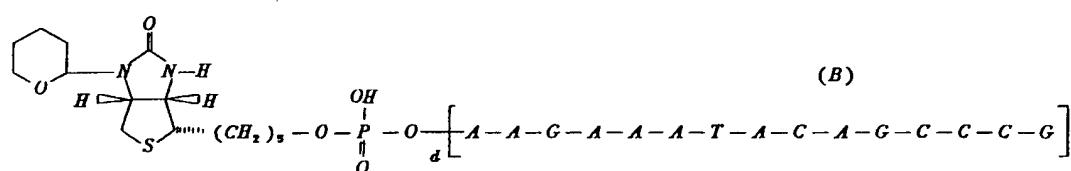
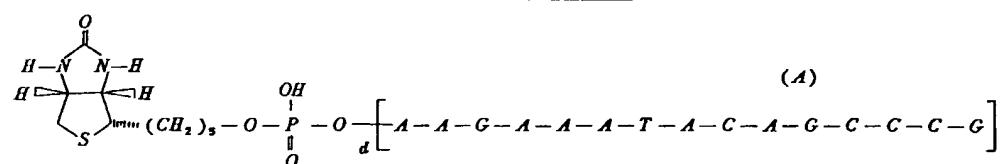
7. 室温、10 分間、1 μg/ml のビオチニル化アルカリホスファターゼを含有する緩衝液 1 中 (溶液約 3 ml / 100 cm² ニトロセルロース)
8. 緩衝液 1 中で 3 分間の室温洗浄。
9. 8と同じ。
10. 0.1 M トリス-HCl (pH 9.5)、0.1 M NaCl, 5.0 mM MgCl₂ (緩衝液 3) 中で 3 分間の室温洗浄。
11. 10と同じ。
12. 室温、アルカリホスファターゼ基質溶液 NBT / BCIP 緩衝液 3 中 (たとえばレアリー (Leary) ら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1983)、80, 4046 に記載)。

インキュベーション 1-11 はサンドイツチボックス中で行われた。基質インキュベーション 12 はシールしたプラスチックバッグ中で暗所において行われた。1/2 時間発色させたのち、37 °C の 1205 スポットがフィルター上で可視状態となつた。この同族体の不整合 (mismatch) により

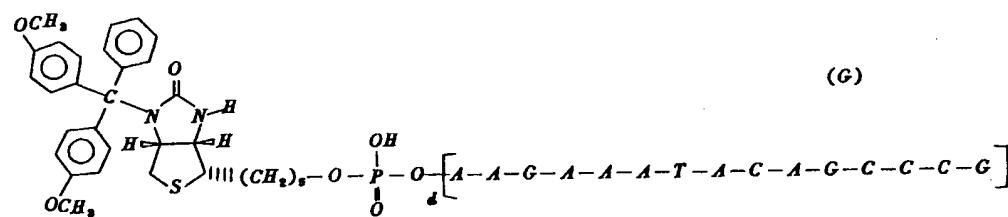
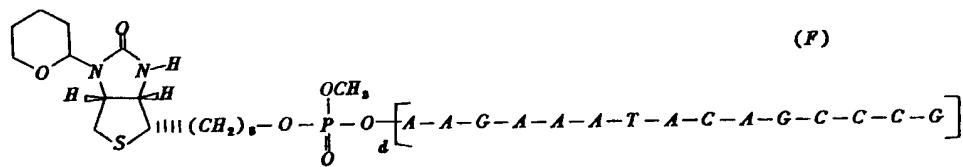
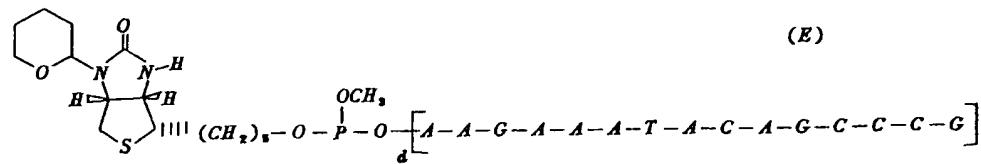
(74)

起こるハイブリッドの不安定化によつて、可視状態となるF6スポットはこれより少なかつた。

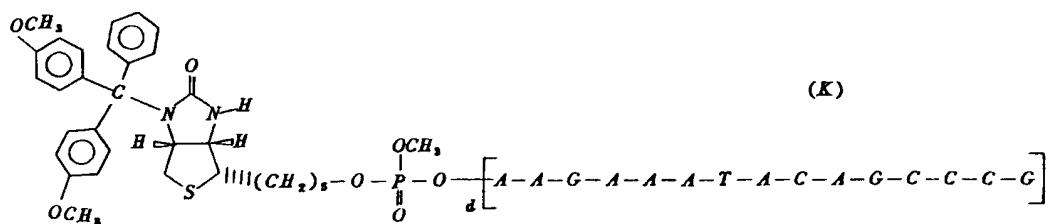
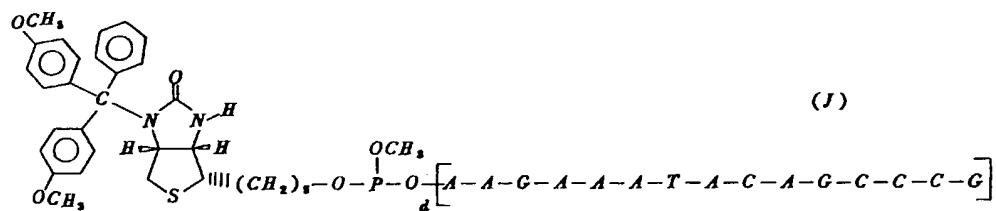
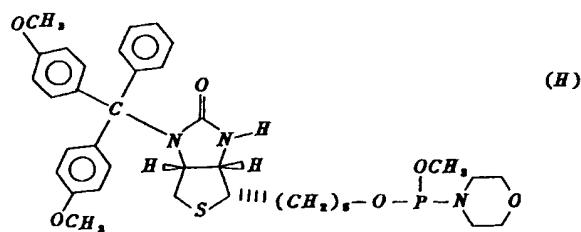
(75)

実施例で述べた構造式

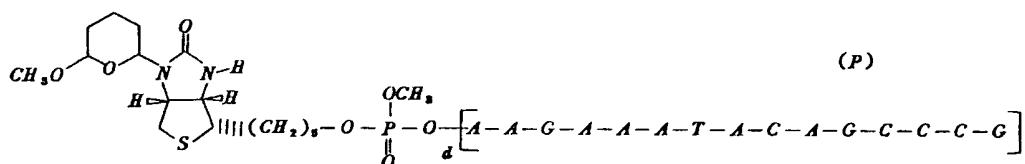
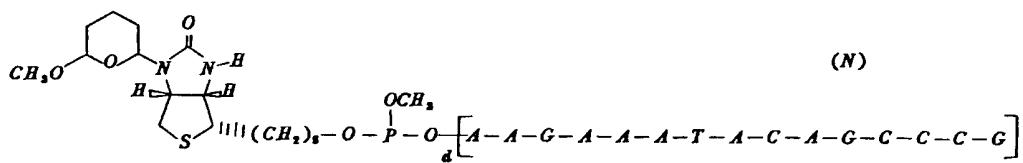
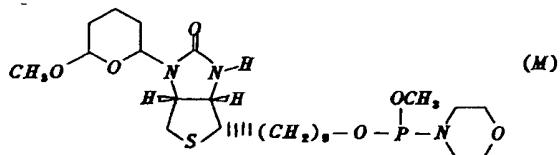
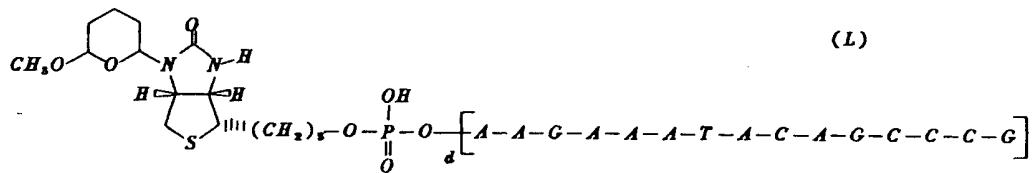
(76)



(77)

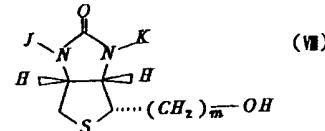
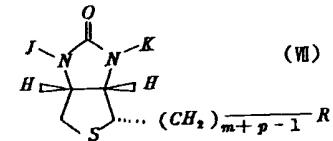
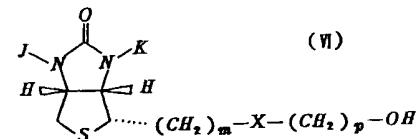
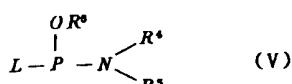
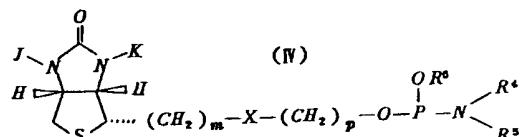
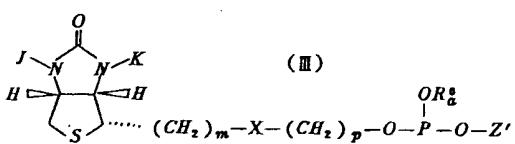
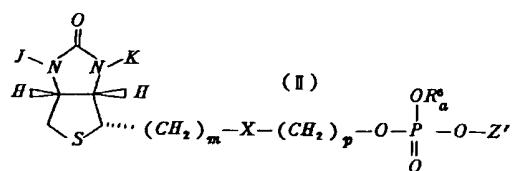
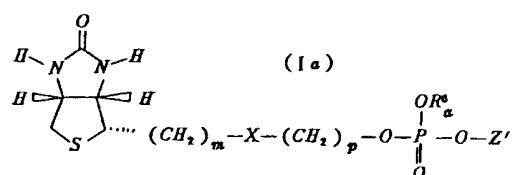
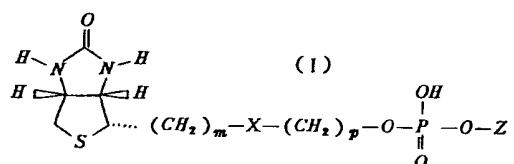


(78)



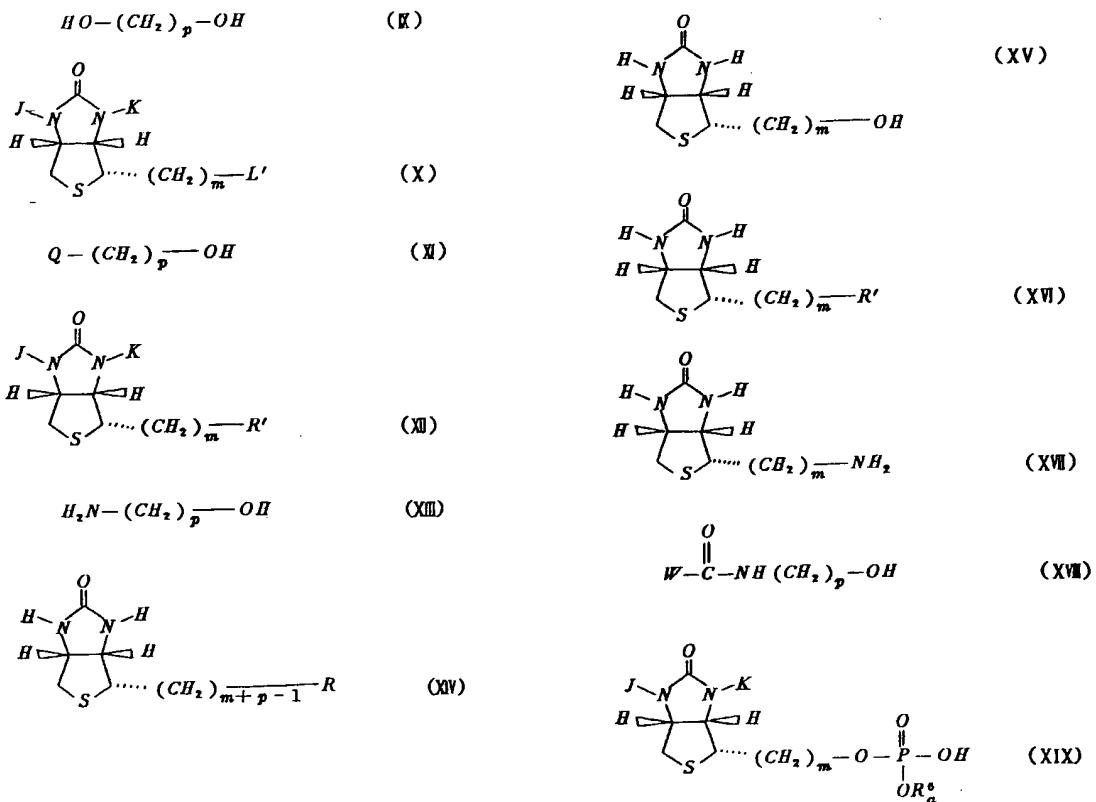
(79)

構造式



(80)

(81)



(82)

(83)